



---

## **Actes des journées coton du Cirad**

**Montpellier, du 17 au 21 juillet 2000**

---

Programme Coton  
Cirad-ca



# Modèles et tests de l'interaction entre toxiques pour les essais biologiques

Christelle POMMIÉ

Cirad-Mabis, TA 70/01, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Éric GOZÉ

Cirad-Mabis, TA 70/01, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

## Introduction

Silvy (1995) estime que les insectes ravageurs sont responsables de 10 à 20% de la perte de la production agricole mondiale. Différents moyens de lutte sont mis en œuvre, et notamment l'application d'insecticides. Cependant, les insectes deviennent résistants. Aussi, des entomologistes pensent à utiliser conjointement deux insecticides, en vue de contourner les résistances et de diminuer les doses d'application. Ils cherchent à mettre en évidence et exploiter les cotoxicités et synergies entre insecticides. Pour cela, des essais de toxiques sont effectués, où des lots d'insectes sont soumis à des doses variées de produits ou de mélange de produits, et où on observe la mortalité.

Les pratiques actuelles d'analyse de ces essais et de détection de cotoxicité consistent à évaluer un coefficient de cotoxicité, CC. Par exemple, Martin et Ochou (1999) ont montré, à partir d'essais de toxiques au laboratoire, que l'endosulfan potentialise la toxicité de la deltaméthrine, quel que soit le ratio, sur les souches résistantes BK99T et BK99G de *Helicoverpa Armigera*. Le critère est le coefficient de cotoxicité 50 ( $CC_{50}$ ) qui se définit en comparant la mortalité observée à la DL50 du mélange (soit 50%) à la mortalité qu'on aurait observée si les composantes de ce mélange avaient agi indépendamment. Cette mortalité attendue se calcule de la façon suivante : un insecte survit au mélange s'il survit au premier produit et au deuxième. Ces deux événements sont indépendants de probabilité  $(1 - p_1)$  et  $(1 - p_2)$ . La mortalité attendue est donc  $1 - (1 - p_1)(1 - p_2) = p_1 + p_2 - p_1 p_2$  (Abott, 1925). Le

coefficient de cotoxicité 50, noté  $CC_{50}$  se définit par le rapport :  $\frac{\text{"observée"} - \text{attendue}}{\text{"observée"}}$ .

"observée" reste entre guillemets car il s'agit en fait d'une mortalité interpolée à partir d'un essai de toxique.

- si  $CC_{50}$  est voisin de 0, il n'y a pas d'interaction,
- si  $CC_{50}$  est compris entre -1 et 0, on a un antagonisme,
- si  $CC_{50}$  est compris entre 0 et 1, on parle de potentialisation.

Strain	n	Ratio (D/E)	LD <sub>50</sub> (µg/g) mixture (fiducial limits)	µg/g deltaméthrine (%Mobs <sup>a</sup> )	µg/g endosulfan (%Mobs <sup>a</sup> )	%Mobs <sup>a</sup> mixture	CC <sub>50</sub> <sup>c</sup>
BK77	144	1:35	2,29 (1,61-3,01)	0,064 (66,0)	2,24 (2,31)	66,8	- 0,34
		1:50	2,24 (0,65-7,74)	0,044 (53,5)	2,20 (2,2)	54,5	- 0,09
BK99T	144	1:35	3,91 (2,43-5,01)	0,11 (0,00)	3,85 (7,87)	7,87	0,84
		1:50	10,66 (7,16-13,69)	0,21 (15,7)	10,50 (32,0)	42,7	0,15
BK99G	144	1:35	7,03 (2,42-10,80)	0,19 (13,6)	6,65 (8,21)	20,7	0,59
		1:50	13,49 (4,77-21,00)	0,26 (19,2)	13,00 (23,8)	38,4	0,23

<sup>a</sup> % mortality observed

<sup>b</sup> theoretical mortality DE = (mortality D + mortality E) - (mortality D x mortality E) (Abbott, 1925)

<sup>c</sup> Cotoxicity Coefficient  $_{50} = (50 - Mth_{mixture}) / 50$

Tableau 1 : DL50 du mélange deltaméthrine et endosulfan aux ratios 1:35 et 1:50.

Les résultats présentés dans le tableau 1 donnent des CC<sub>50</sub> de valeurs 0.84, 0.15, 0.59 et 0.23, ce qui permet de parler de potentialisation.

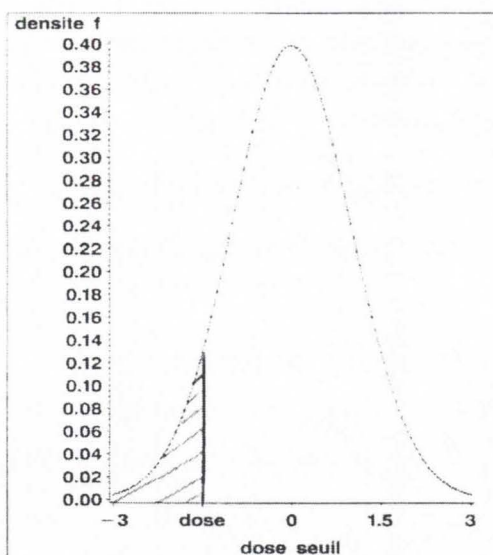
Un problème qui se pose pour l'utilisation de ce coefficient de cotoxicité est qu'on n'en connaît pas la précision, et qu'il n'est pas associé à un test ni à un intervalle de confiance. Le moyen de les obtenir est d'écrire un modèle de cotoxicité, de l'ajuster aux données pour en estimer les paramètres et d'en déduire une mesure de cotoxicité. Alors on pourra associer à cette mesure un test et un intervalle de confiance.

On a donc cherché à proposer un modèle de la cotoxicité, en tenant compte des mécanismes d'action des insecticides. Tout d'abord, examinons les modèles disponibles.

## I – Modèles de la littérature

### 1 – Rappels sur le modèle d'action d'un insecticide seul

Dans le cas d'un seul insecticide, on appelle dose seuil S, la dose appliquée minimale pour faire réagir l'insecte. Elle est différente pour chaque insecte, elle suit une loi de probabilité appelée distribution de tolérance, de fonction de densité f et de fonction de répartition F.



La probabilité de décès d'un insecte est F(d), où d représente la dose appliquée. Ainsi, la probabilité  $p_i$  de mourir par l'application de la dose  $d_i$  s'écrit :



$$p_i = P(S < d_i) = F(d_i).$$

Une transformation linéaire de la dose, ou plus couramment de son logarithme, permet de se ramener à une fonction de répartition standard, que nous appellerons  $\psi$  (probit, logit, Gompertz, ...). Alors :

$$p_i = \Psi(\alpha + \beta \log(d_i))$$

Dans le contexte du modèle linéaire généralisé, la fonction inverse  $\Psi^{-1}$  est appelée fonction de lien, et dans le cas du modèle probit :  $p_i = \Phi\left(\frac{d_i - \mu}{\sigma}\right) = \Phi(\alpha + \beta d_i)$  où  $\Phi$  est la fonction de répartition de la loi normale centrée réduite. On a une correspondance entre position-dispersion et ordonnée à l'origine-pente. Le modèle linéaire pour un insecticide est donné dans l'échelle du prédicteur linéaire  $y$  par :

$$y = \Psi^{-1}(p_i) = \alpha + \beta d_i$$

## 2 – Modèles d'action conjointe de deux insecticides : généralités

Pour les modèles représentant l'action conjointe de deux insecticides, une revue de la bibliographie disponible met en évidence des classifications de ces actions selon Finney (1971), Robertson et Preisler (1992) mais aussi selon Plackett et Hewlett (1967). On trouve deux types d'action conjointe : la synergie et la cotoxicité.

Une synergie au sens strict a lieu quand un produit non toxique en lui-même renforce l'action d'un produit toxique. C'est le cas, par exemple, du PBO qui lève la résistance aux pyréthrinoides due aux oxydases. Parmi les modèles trouvés dans la littérature, le synergiste appliqué à la dose  $d_2$  modifie uniquement la DL50 du toxique appliqué à la dose  $d_1$ . Un de ces modèles est :

$$y = \beta_0 + \beta_1 \log d_1 + \beta_2 \frac{d_2}{\gamma + d_2}$$

La notion de synergie s'élargit à celle de cotoxicité : on parle de cotoxicité quand l'action conjointe des deux toxiques est supérieure à la simple addition des actions individuelles. Mais cette addition n'est pas si simple que cette phrase le laisse penser. On peut en donner deux définitions :

- addition sur l'échelle des logarithmes des survies, c'est ce qui arrive avec l'action indépendante définie plus haut. En effet, on peut écrire :  $\log(1 - p) = \log(1 - p_1) + \log(1 - p_2)$
- addition sur l'échelle des doses, ou de leur logarithme. C'est ce qu'on entend par action additive dans les classifications citées plus haut. Elle est représentée par :  $y = \alpha + \beta \log(d_1 + qd_2)$  où  $q$  est le potentiel relatif des deux insecticides.

Un modèle de cotoxicité doit faire référence à l'une ou à l'autre de ces situations pour définir l'absence de cotoxicité.

## 3 – Modèle de cotoxicité faisant référence à l'action indépendante

Nous avons trouvé un seul modèle décrit faisant référence à l'action indépendante : le modèle d'action indépendante corrélée qui se produit lorsque les distributions de tolérance sont corrélées. Dans ce cas, la probabilité de survie d'un insecte s'écrit  $1 - p = \Phi_1(-y_1, -y_2)$ , où  $\Phi_1$  est la fonction de répartition de la loi normale bivariée de coefficient de corrélation  $\rho$ .

Ce modèle permet de détecter une synergie apparente puisque lorsque  $\rho=0$  (Figure 1), on se ramène au modèle d'action indépendante.

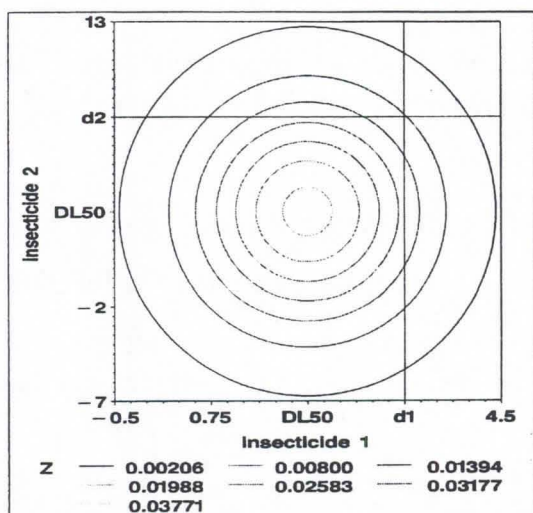


Figure 1

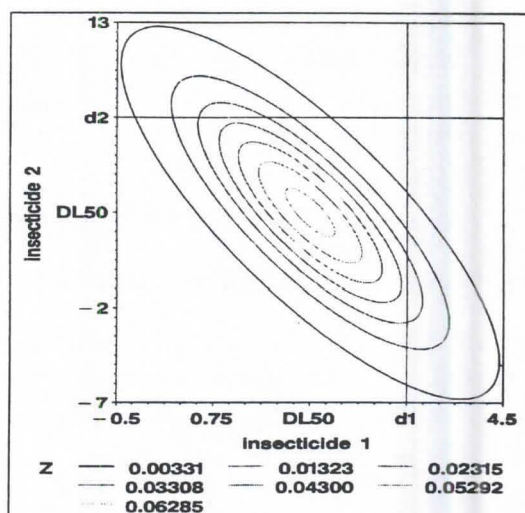


Figure 2

Figure 1 : Représentation des isovaleurs de la densité conjointe deux variables gaussiennes non corrélées.

Figure 2 : Représentation des isovaleurs de la densité conjointe deux variables gaussiennes corrélées, de coefficient de corrélation  $\rho < 0$ .

Le carré en haut à droite représente la zone où l'insecte survit. Sa probabilité est le volume sous la courbe de densité dont on a tracé les isovaleurs. Lorsque  $\rho < 0$  (Figure 2), si l'insecte ne réagit pas à un produit, il réagit à l'autre. La probabilité de survie d'un insecte dans ce cas est plus faible que dans le cas  $\rho = 0$ . Ce résultat peut être confondu avec une synergie apparente. Le contraire est observé lorsque  $\rho > 0$ .

Incidence pratique : hétérogénéité du poids des insectes  $\Rightarrow$  corrélation positive des tolérances  $\Rightarrow$  apparent antagonisme.

En effet, un insecte de poids important nécessite des doses plus grandes de produits (pour les deux insecticides) qu'un insecte plus léger. Un insecte réagit d'autant plus que son poids est faible, d'où une corrélation positive entre les deux doses seuils. Lorsque  $\rho > 0$ , la probabilité de survie d'un insecte est plus forte que dans le cas  $\rho = 0$ , d'où un antagonisme apparent.

#### 4 – Modèle de cotoxicité faisant référence à l'action additive

C'est là que la littérature est la plus abondante.

Les modèles d'interaction les plus communs de la littérature sont donnés par :

- Finney (1971) sous la forme :  $y = \alpha + \beta \log(d_1 + qd_2 + k\sqrt{qd_1d_2})$  où l'absence d'interaction se produit pour  $k = 0$ .
- Carter *et al.* (1988) sous la forme :  $y = \beta_0 + \beta_1d_1 + \beta_2d_2 + \beta_{12}d_1d_2$  où l'absence d'interaction se produit pour  $\beta_{12} = 0$ .

Un autre modèle est donné par Barton *et al.* (1993) représentant un modèle d'action conjointe indépendante non additive. Enfin, Jia et Rao (1994) suggèrent un modèle paramétrique, généralisation de l'action indépendante et additive. Cependant, les deux doses seuils doivent suivre une loi asymétrique de Weibull.

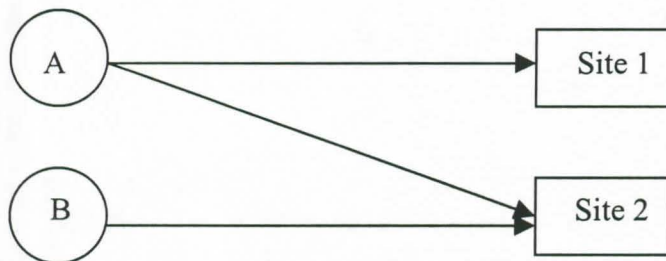


Notre but est de rechercher un modèle pour l'action conjointe de deux insecticides agissant sur des sites différents. L'absence d'interaction doit donc se traduire par une action indépendante.

Conclusion : les modèles d'action conjointe décrits dans la littérature ne sont pas satisfaisants. En effet, soit ils ne traitent que de la synergie pure, soit ils font référence à une action additive, et non à l'action indépendante, soit ils prennent en compte l'interaction sous forme d'une corrélation entre susceptibilités, qui est peu vraisemblable dans le cas d'insecticides de nature différente.

## II – Modèle d'action indépendante plus additive

Nous allons donc proposer un nouveau modèle, où un insecticide A agit sur deux sites différents : un site primaire et un site secondaire. La toxicité secondaire est exploitée en la renforçant à l'aide du deuxième insecticide B. Ce cas représente une réalité biologique établie et prouvée par plusieurs entomologistes, notamment Ramadan *et al.* (1988), Hassall (1990) et aussi Zlotkin (1999).



On cherche à traduire cette hypothèse biologique en modèle mathématique. L'interaction a lieu au niveau de ce site, on suppose une action additive sur le site secondaire.

On considère que chacun des sites est caractérisé par une distribution de tolérance, l'une au produit A seul, l'autre aux produits A et B. Un insecte survit s'il survit à l'action sur le site 1 et à l'action sur le site 2. On suppose que les deux distributions de tolérances sont indépendantes. Alors la probabilité de survie s'écrit :

$$1 - p = (1 - p_1)(1 - p_2)$$

avec  $\begin{cases} p_1 = \Phi(y_1) \\ p_2 = \Phi(y_2) \end{cases}$

et  $\begin{cases} y_1 = \alpha_1 + \beta_1 \log(d_A) \\ y_2 = \alpha_2 + \beta_2 \log(d_B + qd_A) \end{cases}$


Ce modèle généralise l'action indépendante, en effet l'absence de cotoxicité ( $q = 0$ ) se ramène bien à une action indépendante. Formellement, il généralise aussi l'action additive : il suffit que le produit A n'agisse pas sur son site principal, ici le site 1.

Il est original car il est le seul à généraliser l'action indépendante et il ne se ramène pas (même approximativement) à un cas classique. Il correspond à l'idée d'une cotoxicité que veulent mettre en évidence des entomologistes. On va maintenant proposer un test pour mettre en évidence et quantifier cette cotoxicité.

### III – Notion de pente critique

Afin de réaliser un test pour mettre en évidence une cotoxicité, on utilise un dispositif très simple, avec 3 objets : chacun des produits purs à leur DL100p, et le mélange des deux, toujours à leur DL100p. Pour simplifier la situation, on n'utilise pas de témoin non traité. On le ferait s'il fallait prendre en compte une mortalité naturelle.

#### Dispositif :

Doses A		
Doses B	0	$DL100p_A$
0		<b>1</b>
$DL100p_B$	<b>2</b>	<b>3</b>

Par construction, le nouveau modèle tient à la fois du modèle d'action indépendante et du modèle additif. Le site secondaire ajoute une composante additive à un modèle au départ multiplicatif. Pour savoir si un tel test peut mettre en évidence une cotoxicité, il est donc important de voir s'il permet de départager un modèle additif d'un modèle indépendant. Nous allons montrer qu'il existe une pente que nous appellerons pente critique pour laquelle ces deux modèles sont équivalents pour ce dispositif. Nous allons pour cela étudier l'interaction sous un angle particulier : quelle est l'action combinée des deux produits appliqués à leur DL50 ?

#### Indépendant contre additif :

Avec un modèle d'action indépendante, les mortalités sur chacun des sites sont de 50%, la mortalité combinée est alors de 75%. Avec un modèle d'action additive où  $y = \alpha + \beta \log(d_1 + qd_2)$  quand on combine les deux DL50, tout se passe comme si on doublait la dose d'un des produits. Rappelons que  $y$  est le prédicteur linéaire de  $p$ ,  $y = \Psi^{-1}(p)$ , avec  $\Psi^{-1}$  fonction de lien. En effet : si  $DL50_1$  est la dose létale du produit 1,  $\alpha + \beta \log(DL50_1) = \Psi^{-1}(0.5)$ , de même si  $DL50_2$  est la dose létale du produit 2,  $\alpha + \beta \log(qDL50_2) = \Psi^{-1}(0.5)$  donc  $DL50_1 = qDL50_2$ .

La combinaison de ces deux produits à leur DL50 donne une mortalité  $p$  telle que :

$$\Psi^{-1}(p) = \alpha + \beta \log(DL50_1 + qDL50_2) = \alpha + \beta \log(2DL50_1) = (\alpha + \beta \log(DL50_1)) + (\beta \log(2))$$

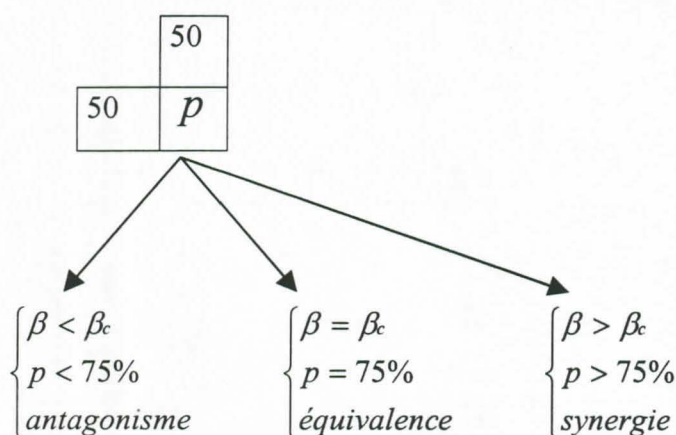
Par rapport à la DL50 d'un produit seul, la variation de  $y$  est  $\Delta y_{add} = \beta \log_{10}(2)$ .

Dans le cas d'action indépendante, on a :  $\Delta y_{ind} = \Psi^{-1}(0.75) - \Psi^{-1}(0.5)$ , puisque l'on passe de 50 à 75% de mortalité.



On peut donc introduire la pente critique 50, notée  $\beta_{c50} = \frac{\Delta y_{ind}}{\log_{10}(2)}$ .

Quand la pente commune aux deux produits est supérieure à la pente critique, la combinaison de deux produits donne une mortalité supérieure avec le modèle additif qu'avec le modèle d'action indépendante. Un modèle d'action additive donnera alors une apparente synergie. Au contraire, quand la pente est inférieure à la pente critique, des insecticides d'action additive donneront un apparent antagonisme. Enfin, pour une pente égale à la pente critique, insecticides d'action indépendante ou d'action additive donneront les mêmes résultats avec ce dispositif.



On peut généraliser le calcul de la pente critique à une  $DL100p$  quelconque : la pente critique  $100p$ , notée  $\beta_{c100p} = \frac{\Psi^{-1}(p(2-p)) - \Psi^{-1}(p)}{\log_{10}(2)}$ . Par exemple, la pente critique 50 vaut 3.6495

pour le modèle logit et 2.2406 pour le modèle probit et la pente critique 90 vaut 7.9656 pour le modèle logit et 3.4704 pour le modèle probit. On voit là que par rapport à un modèle d'action indépendante, des insecticides d'action additive de pente 5 par exemple, apparaîtront synergiques à la DL50 et antagonistes à la DL90 pour le modèle logit.

On peut donc tirer la conclusion pratique suivante : pour passer de la  $DL100p$  à la  $DL100p(2-p)$  à l'aide de deux produits de même pente  $\beta$ ,

- si  $\beta > \beta_{c100p}$ , on a intérêt à forcer la dose d'un des produits,
- si  $\beta < \beta_{c100p}$ , on a intérêt à combiner les deux produits.

On peut alors supposer que le modèle indépendant + additif sera synergique si les pentes des droites probit de chacun des sites sont supérieures à la pente critique  $100p$ .

A l'aide de simulations, on a effectivement établi que quand il existe un site secondaire pour un toxique, chercher une synergie en renforçant l'action sur ce site par un deuxième insecticide n'est intéressant que si la pente de la réponse des sites à ces insecticides est suffisante.



#### IV – Puissance du test

On reprend le dispositif précédent : avec un modèle d'action indépendante, le taux de survie de l'objet 3 devrait être le produit des taux de survie pour les objets 1 et 2. Tout écart à cette hypothèse est compté comme une synergie ou un antagonisme.

On se place ici dans le cadre d'une combinaison de deux DL50.

Nous avons tracé les courbes de puissance en fonction de  $q$  (paramètre du modèle pour le site 2) à l'aide de simulations faites en prenant 3 valeurs de pentes : la pente critique, le double et la moitié environ. Le test a été réalisé dans chacun des cas pour 30 et 150 insectes testés et 3 valeurs du risque  $\alpha$ , 1%, 5% et 10%. Deux pentes ont été seulement retenues pour cette présentation :  $\beta > \beta_c$  et  $\beta = \beta_c$ , et le nombre d'insectes par dose est 150.

Cas  $\beta > \beta_c$ ,  $\alpha=5\%$  et  $n=150$  :

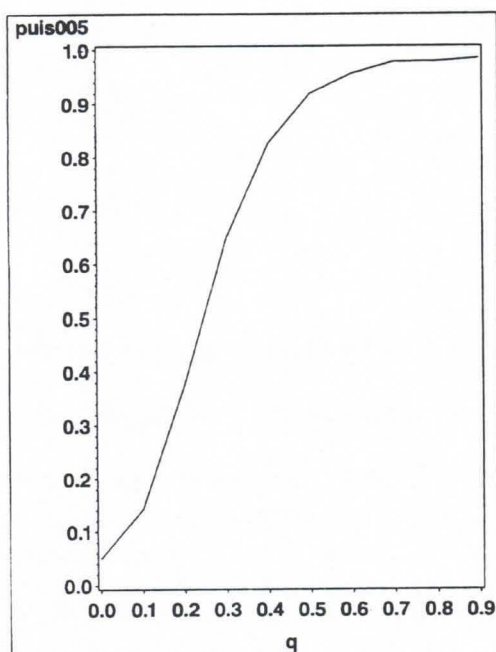


Figure 1

Cas  $\beta = \beta_c$ ,  $\alpha=10\%$  et  $n=150$  :

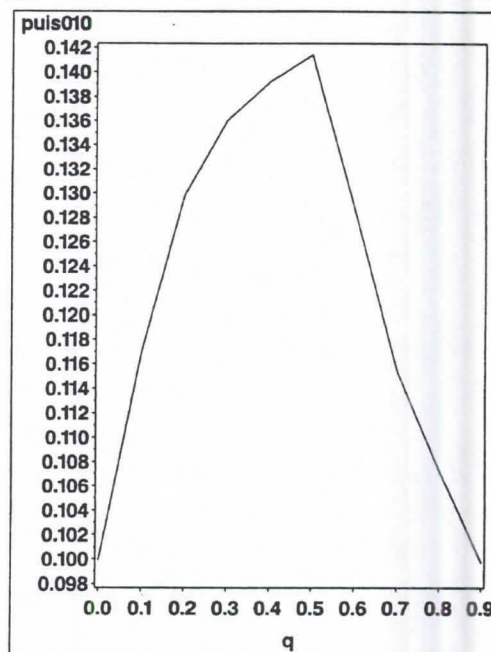


Figure 2

Figure 1 : Représentation de la puissance en fonction de l'écart à l'hypothèse nulle pour une pente de 7.5, 150 insectes testés et pour 10000 essais, avec un risque d'erreur  $\alpha$  de 5%.

Figure 2 : Représentation de la puissance en fonction de l'écart à l'hypothèse nulle pour une pente de 3.6495, 150 insectes testés et pour 10000 essais, avec un risque d'erreur  $\alpha$  de 10%.

Dans le cas de la Figure 1, la probabilité de décès obtenue par le modèle indépendant + additif quand on combine les DL50 est supérieure à 75%, ce qui se traduit par une synergie. Ceci explique que la puissance soit d'autant plus forte que  $q$  augmente. La valeur maximale de la puissance est obtenue pour  $q = 0.9$  et vaut 0.98.

Dans le cas de la Figure 2, la probabilité de décès obtenue par le modèle indépendant + additif quand on combine les DL50 est de 75%, ce modèle est donc équivalent à celui de l'action indépendante. Ceci explique que la puissance soit faible. Lorsque  $q = 0$  ou  $q$  tend vers 1, les modèles additif et multiplicatif sont équivalents, ceci explique que la puissance

tend vers le risque  $\alpha$ , ici 0.1. En  $q = 0.5$ , la puissance atteint un maximum modeste, en dessous de 15%. A la pente critique, c'est pour cette valeur de  $q$  que les deux modèles sont les plus différents.

On peut donc dire que la puissance du test de cotoxicité sera la plus élevée pour des pentes faibles ou fortes et pour 150 insectes testés. Le modèle d'action indépendante avec site secondaire permettra alors de détecter un antagonisme ou une synergie.

## Conclusion

C'est un premier travail qui a été réalisé : proposition d'un modèle particulier détectant des synergies entre insecticides agissant sur des sites différents avec une action sur un site secondaire. Tous les résultats ont été établis à la DL50 mais sont à étendre à une dose létale quelconque.

La puissance du test dépend de la pente et du nombre d'insectes testés. Tester avec 150 insectes par dose revient à en utiliser 450 avec notre dispositif, ce qui ne représente pas plus que ce qui est utilisé dans l'exemple donné en introduction et permet de proposer un test et un intervalle de confiance sur la cotoxicité.

En recommandation pratique, on peut dire que renforcer l'action sur le site secondaire ne sera avantageux que pour des pentes de réponse des sites suffisantes. Encore s'agit-il des pentes des réponses des sites au mélange, et non des réponses globales de la mortalité aux produits, ce qui n'est pas la même chose dans le cas du produit A. En terme de réponse brute à l'insecticide agissant sur les deux sites, la pente critique devra être encore plus forte.

Une autre propriété peut être retenue : comme la pente critique varie suivant le centrage de l'expérience (DL50 ou une autre dose létale, par exemple la DL90), des produits synergiques à leur DL50 peuvent apparaître antagonistes à leur DL90.

Les perspectives qui peuvent être envisagées seraient de réaliser ce test avec une autre dose létale, notamment celle permettant d'obtenir 50% de mortalité au mélange et ceci afin de se placer dans des conditions similaires à celles utilisées en introduction.

Il serait intéressant aussi de déterminer la pente critique de la réponse à chacun des produits en fonction de celle de la réponse des sites à ces insecticides.

Ce modèle a été proposé suite à une idée des entomologistes sur les mécanismes d'action des insecticides. Aussi, une suite possible de ce travail pourrait être de proposer d'autres modèles répondants à d'autres mécanismes d'action.

## Bibliographie

ABOTT W.S., 1925. A method of comparing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.

BARTON C.N, BRAUNBERG R.C et FRIEDMAN L., 1993. Nonlinear statistical models for the joint action of toxins. *Biometrics*, 49, 95-105.

CARTER W.H., GENNINGS C., STANISWALIS J.G., CAMPBELL E.D. et WHITE K.L., 1988. A statistical approach to the construction and analysis of isobolograms. *Journal of the American College of Toxicology*, 7, 963-973.



- FINNEY D.J, 1971. Probit analysis (3<sup>ème</sup> édition). *Londres : Cambridge University Press.*
- HASSALL K.A., 1990). The biochemistry and uses of pesticides (2<sup>ème</sup> édition). *Weinheim : VCH.*
- JIA X. et RAO M.B., 1994. A new modeling approach for joint action of drugs. *In ASA Proc. Biopharm. Sect.*, 154-159.
- MARTIN T. et OCHOU G.O., 1999. Endosulfan synergise toxicity of deltamethrin on *Helicoverpa armigera* resistant strain. *Contract d'étude passé entre le CIRAD et le CNRA.*
- PLACKETT R.L. et HEWLETT P.S., 1967. A comparison of two approaches to the construction of models for quantal responses to mixtures of drugs. *Biometrics*, 23, 27-44.
- RAMADAN A.A., BAKRY N.M., MAREI A.S.M., ELDEFRAWI A.T. et ELDEFRAWI M.E., 1988. Action of pyrethroids on GABA<sub>A</sub> receptor function. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 32, 97-105.
- ROBERTSON J.L. et PREISLER H.K., 1992. Pesticide bioassays with arthropods. *Boca Raton : CRC Press.*
- SILVY C., 1995. Quantifions le phytosanitaire II. *Courrier de l'environnement de l'INRA*, 25, 80-91.
- ZLOTKIN E., 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual Revue of Entomology*, 44, 429-455.